

A magyar peptid- és fehérjekutatás Dóm téri születése és a közelmúlt kutatási irányai

A 19. század második felében vált nyilvánvalóvá, hogy az élő rendszereket felépítő legfontosabb molekuláknak, a fehérjéknek az alapegységei az aminosavak, és ugyancsak aminosavak építik fel a peptideket is. A peptidek aminosavakból felépülő, az alfa-amino- és karboxilcsoport között kialakuló savamidkötéssel összekapcsolt vegyületek. A peptidkötés az élő szervezetekben megtalálható egyik legfontosabb kovalens kapcsolat. Mind kialakítása, mind elbontása alapvető jelentőségű akár biológiai, akár kémiai szempontból. A peptidek legkézenfekvőbb csoportosítása az őket felépítő aminosavak száma alapján történhet, két aminosavból egy peptidkötéssel dipeptid, három aminosavból két peptidkötéssel tripeptid, négy aminosavból tetrapeptid és így tovább. A számozás a görög számnevek alapján folytatódik, és néhányszor tízes nagyságig tart. 50–100 aminosav felett már fehérjéről kezdünk beszélni. A néhány aminosavból felépülő peptideket oligopeptideknek, a nagyobb tagszámúakat polipeptideknek nevezzük.

A peptidek jellemzésének legelső kérdése az őket felépítő aminosavak minősége. Azonban már két aminosav is legalább két különböző módon tud összekapcsolódni, három aminosavnál minimum hatféle lehetőség van, ami a tagszám növekedésével exponenciális növekedésnek indul. A peptideket tehát a felépítő aminosavak milyensége mellett kapcsolódási sorrendjükkel is jellemeznünk kell. Ezt az információt a peptid szekvenciájának nevezzük. A peptidek felírasmódja mindig attól az aminosavtól kezdődik, amelynek szabad aminocsoportja van, ez az első aminosav. Az utolsó aminosav karboxilcsoportja nem vesz részt peptidkötés kialakításában, ez a C-terminális aminosav, míg az előzőt N-terminálisnak nevezzük. Mivel a peptidek tulajdonképpen aminosav heterooligomerek, így kémiai-fizikai tulajdonságaik nagymértékben hasonlítanak az aminosavakéhoz. Az aminosavak izolálása, szerkezetfelderítése egyébként a 19. század elején kezdődött és egészen a 20. század közepéig tartott.

Kémiai peptidszintézis:

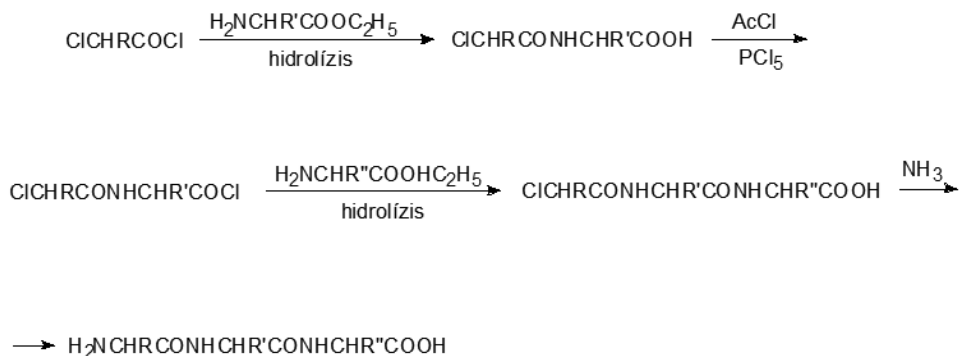
A kémiai peptidszintézis során az alábbi fő problémákat kell megoldanunk:

1. A peptidkötés nem önként végbemenő folyamat, az aminocsoport és a karboxilcsoport közötti, a vízkilépéssel járó kondenzációs reakció létrejöttéhez vagy az amino-, vagy a karboxilcsoportot aktiválnunk kell.

2. Biztosítanunk kell az egyértelmű reakciót, ezért a reagáltatni nem kívánt csoportokat védőcsoportokkal kell ellátnunk.
3. A szintézis végén a többé már nem szükséges védőcsoportokat el kell távolítanunk.
4. A kapott peptidet izolálnunk kell, és megfelelő módon bizonyítanunk kell a szerkezetet és a homogenitást.



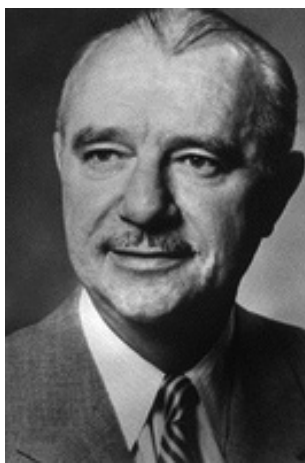
Hermann Emil Fischer
(1852. október 9.–1919. július 15.)



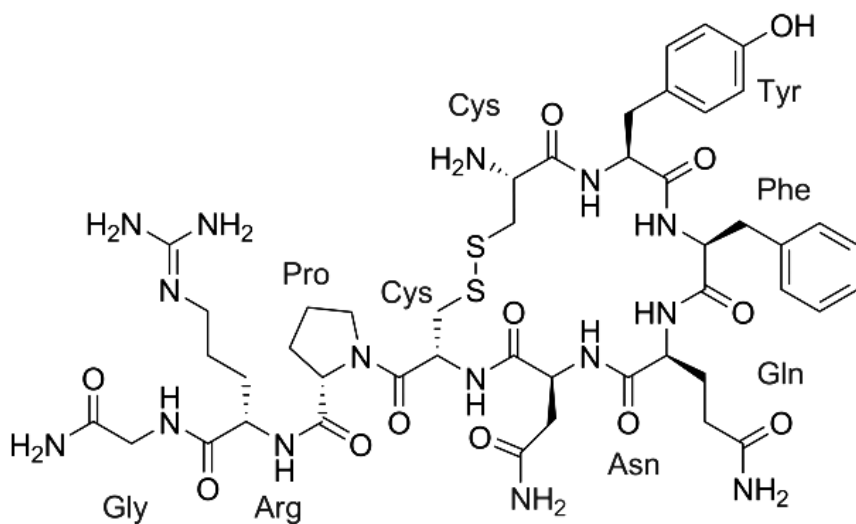
1. ábra

A fenti problémák miatt, annak ellenére hogy Fischer és Abderhalden már a 19. sz. végén leírta az első kémiai peptidszintézist (1. ábra) és az első, még ma is használatos védőcsoportot már 1932-ben leírta Bergmann és Zervas,

az igazán teljesítőképességnek tekinthető „modern” peptidkémia csak az ötvenes években duVigneaud 1953-as, később Nobel-díjjal jutalmazott munkájával kezdődött (oxitocin- és vazopresszinszintézis, 2. ábra) és végül a szilárdfázisú szintézis bevezetésével (R.B. Merrifield, Nobel-díj 1984, 3. ábra), valamint számos más újítással (pl. natív kémiai ligáció, S.B.H. Kent, 4. ábra) a 20. sz. vége felé vált kellően hatékonnyá.



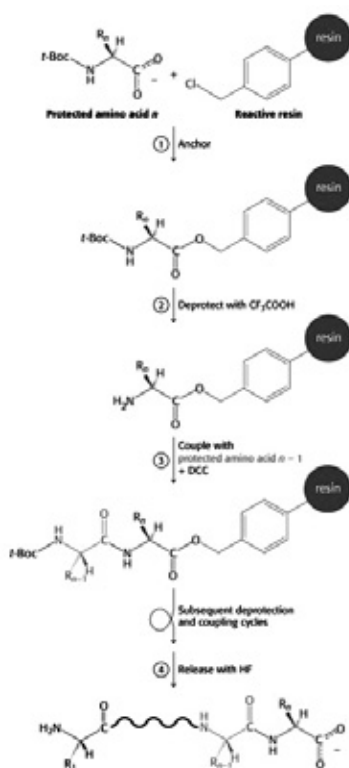
Vincent du Vigneaud
(1901. május 18.–1978. december 11.)



2. ábra



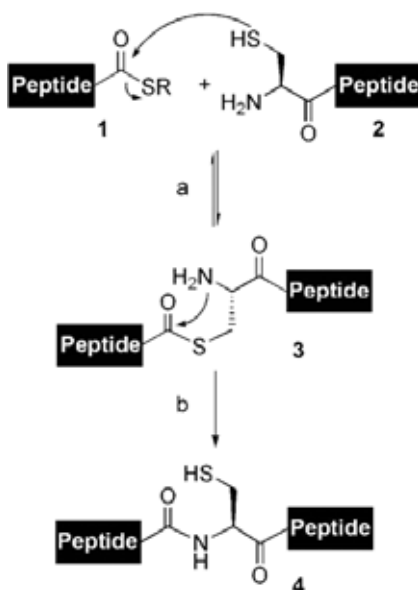
Robert Bruce Merrifield
(1921. július 15.–2006. május 14.)



3. ábra



Stephen Brian Henry Kent
(1945. december 12.-)



4. ábra

A 20. század első felében csak a világ néhány legfejlettebbnek tartható országában foglalkoztak peptid- és fehérjekutatással. Fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy Szent-Györgyi Albert Nobel-díjával azonos évben, részben éppen Szent-Györgyi egyik intézetéből jelent meg az a közlemény, amelyet a magyar

peptid- és fehérjekutatás elindítójának tekinthetünk. Így azt is kijelenthetjük, hogy a magyar peptid- és fehérjekutatás Szegeden, a Dóm téren született, és ez a születési idő az 1937-es év. Bruckner és Ivanovics úttörő munkája (5. ábra) a lépfene bacillus tokanyagának rendhagyó szerkezetére vonatkozott. Korábbi tudásunk szerint ugyanis a fehérjék kizárólag L-alfa-aminosavakból és alfa-kötéssel épülnek fel, és a lépfene tokanyaga pedig D-aminosavat tartalmazott, ráadásul ez egy gamma-kötéssel felépülő monoton polimer. Bruckner Győző 1949-ben az ELTE-re nyert tanszékvezetői kinevezést, és ezzel a szegedi ilyen irányú kutatások 1964-ig Kovács Kálmán professzor Szegedre kerüléséig szüneteltek. Természetesen ebben az időben Budapesten számos fontos eredmény született, többek között oxitocin és ACTH-szintézis, enkefalin és LHRH-kutatások stb. Ezekben a munkákban fontos szerepet játszott Bodánszky Miklós, Medzihradszky Kálmán, Kisfaludy Lajos, Bajusz Sándor, Teplán István.

Ober die chemische Natur der immunspezifischen Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen.

Nach Beobachtungen von GRUBER und FUTAKI (Mösch. med. Wochr. 1907, 249), weiterhin von PREIS [Zbl. Bakter. 46, 209 (1907)] wurde es bekannt, daß die Virulenz der Milzbrandbazillen mit ihrer Kapselbildungsfähigkeit eng verknüpft ist. TOMEZE und Mitarbeiter (Bericht über die „Wissenschaftliche Woche zu Frankfurt 1934“) konnten später zeigen, daß nur solche Milzbrandsera Tiere gegen die Infektion zu schützen vermögen, die auch antikapsuläre Immunkörper enthalten. Vor kurzem gelang es IVÁNOVICS [Zbl. Bakter. 198, 211 (1937)], die spezifische Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen auch als Produkt verschiedener, aerober, sporentragender Saprophyten nachzuweisen, wodurch erst die Möglichkeit ihrer verhältnismäßig leichten Gewinnung und ihres eingehenderen Studiums geschaffen wurde.

Die immunspezifische Kapselsubstanz konnte durch verdünnte Alkalien herausgelöst werden. Da sie eine kolloidal wasserlösliche, nicht dialysierbare, organische Säure darstellt, konnte sie in Form ihrer schwerlöslichen Schwermetallsalze abgeschieden und aus diesen wiederum in Freiheit gesetzt werden. Durch systematisches Verfolgen dieses Reinigungsprinzips, dem auch noch eine andauernde Dialyse angeschlossen wurde, ließ sich die spezifische Substanz in ziemlich hoher Reinheit abtrennen. Durch Eindampfen ihrer wässrigen Lösung wurde sie in Form amorpher, leimartiger Lamellen gewonnen, die noch einen kleinen Aschengehalt aufwiesen. Ihre wichtigsten Merkmale waren: Äquivalentgewicht = 147,7. Gesamtstickstoff = 10,4%, Aminostickstoff = 0,18%, Aschengehalt = 2,3%, Optisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{25} = -21^\circ$; sie zeigte keine Eiweißreaktion.

Auf ihre chemische Konstitution konnte man aus ihrem, durch salzsaure Hydrolyse gewonnenen Abbauprodukt schließen. Aus 1,8 g Substanz wurden nämlich 2,2 g l-Glutaminsäure-chlorhydrat gewonnen, woraus — wenn auch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften in Betracht gezogen werden — mit Recht geschlossen werden konnte, daß die spezifische Kapselsubstanz eine aus l-Glutaminsäureresten aufgebaute, hochmolekulare, polypeptidartige Verbindung ist.

Dieser Befund ist um so mehr beachtenswert, da l-Glutaminsäure bisher weder als Baustein nativer Produkte, noch in freier Form, in der Natur aufgefunden wurde, ferner aus einer einzigen Aminosäure aufgebaute polypeptidartige Naturprodukte — unseres Wissens nach — bisher nicht bekannt waren.

Es drängt sich nun unwillkürlich die Vermutung auf, daß die spezifische Kapselsubstanz die gegen die proteolytischen Enzyme der höheren Organismen empfindlichen Bakterienzentren als fermentresistenter Schild zu schützen vermag. Denn — wie bekannt — wirken proteolytische Enzyme höherer Organismen nur auf solche Polypeptide ein, die aus in nativen Eiweißstoffen auffindbaren Aminosäuren aufgebaut sind. Durch diese Vermutung lassen sich die über die Virulenzbedingungen der Anthraxstämmen gemachten Beobachtungen theoretisch gut begründen.

Eine ausführliche Mitteilung erscheint demnächst an anderer Stelle.

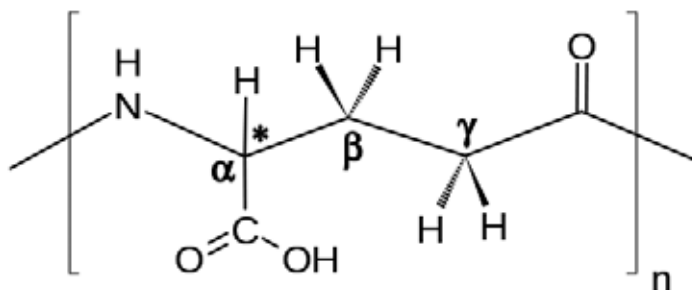
Szeged (Ungarn), Hygien. u. Allg. Path. Institut; Organ. u. Pharmaceut. Chem. Institut der Universität, den 18. März 1937. G. IVÁNOVICS. V. BRUCKNER.



Ivánovics György
(1900. november 1.–1980. március 8.)



Bruckner Győző
(1904. június 11.–1980. szeptember 1.)



5. ábra. Az anthrax polipeptid szerkezete

Nem természetes, ill. béta-aminosavak szintézisei

A Szerves Kémiai Tanszéken 1964-ben induló peptidkutató csoport első jelentős témája volt a β -aminosavak előállításának kidolgozása. A fentiek szerint a természetben elterjedt aminosavak ugyan többségükben alfa-aminosavak, de elméleti és gyakorlati jelentőségű, a szerkezeti és konformációs viszonyokban kissé különböző β -aminosav polimerek vizsgálata. Erre a célra dolgoztuk ki a β -aminosavak kémiai szintézisének új módszerét: az α -aminosavakból kiindulva diazoketon-képzés után lánchosszabbító szintézissel beépítettünk az aminosavba egy új $-\text{CH}_2-$ csoportot. Az így előállított β -aminosavak megőrizték az eredeti α -aminosav konfigurációját, tehát optikailag aktívak maradtak. Ezzel a módszerrel egy sorozat β -aminosavat állítottunk elő és

alkalmaztuk ezeket peptid analógok szintézisére. (A β -aminosavakból felépülő peptidek ellenállók a fehérjebontó enzimekkel szemben, ezért gyógyszeripari alkalmazásuk előnyös).

A β -aminosavak kutatása most a reneszánszát éli: számos kutatócsoport foglalkozik a szintetikus β -aminosavakból felépülő polipeptidek téralkati (konformációs) és térszerkezeti viszonyainak vizsgálatával, pl. a foldamer kémia keretein belül.

Gasztrin ésolecisztokinin szintézisek

Az 1970-es években több új peptidhormont izoláltak az emésztőcsatornából, többek között a gyomor nyálkahártyájában képződő gasztrint és az epehólyag összehúzódását és a hasnyálmirigy enzimtermelését serkentőolecisztokinint. Ezek a szöveti hormonok több molekuláris formában fordulnak elő: a gasztrin 4, illetve 17 aminosavat, aolecisztokinin különböző formái 8, illetve 33 aminosavat tartalmaznak. (Később kiderült, hogy ezek a peptidhormonok az agyban is előfordulnak: mint neurohormonok az étvágy szabályozásában vesznek részt).

Intézetünk kutatói az I. Belgyógyászati Klinika és a Kórélettani Intézet kutatóival együttműködve dolgoztak ezen a területen. Kémiai szempontból nagy kihívás volt a gasztrin és aolecisztokinin szintézise: mindkét hormonnak van olyan (aktív) alakja, amelyben a tirozin aminosav hidroxilcsoportja egy kénsavészter (szulfátcsoportot) tartalmaz. A sejtjeinkben ez a szulfatálás rendkívül egyszerűen, egy enzim katalízisével valósul meg. Kémiailag, in vitro megközelítve sokkal bonyolultabb problémát kell megoldani: egy olyan reagenst kellett találnunk, amelyik szelektív módon építi be a szulfátészter csoportot a peptidláncban lévő tirozinba. Az irodalomban elsőként mi írtunk le ilyen reagenst (acetyl-pyridinium-sulfate). Ennek segítségével szintetizáltuk a gasztrin és aolecisztokinin, a 33 aminosavból álló CCK-33 szulfátészterét is.

Neuropeptidkutatások

Az aktív népesség körében a neurológiai (sclerosis multiplex, amyotrófiás laterál sclerosis, migrén), a hangulati (szorongás, depresszió) és addiktív betegségek, míg az idősök esetében az Alzheimer-kór az egyik legfontosabb morbiditási tényező. Munkánk során elsősorban olyan neuropeptidok vizsgálatára koncentráltunk, amelyek antidepresszáns, szorongásoldó vagy a memória és a tanulási folyamatokat befolyásoló hatással rendelkeznek. A központi

idegrendszer szabályozásban számos neuropeptid vesz részt, ennek ellenére azonban csak nagyon kevés peptidalapú gyógyszer került kifejlesztésre. Az okok között szerepelhetnek az ADMET problémák, valamint, hogy számos olyan új neuropeptidet fedeztek fel mostanában, amelyek hatásmechanizmusát még nem ismerjük. Az is ismert, hogy a jelenleg használt antidepresszáns kezelésre az estek kb. 1/3-ában rezisztencia alakul ki, és támadáspontjukat tekintve elsősorban a központi idegrendszeri klasszikus neurotranszmittereket érintik. Ezek a munkák az SZTE Kórélettani Intézetével kooperációban készülnek.

Egy másik vizsgált molekula a szervezetben is nagy mennyiségben előforduló PACAP (Pituitary adenyl cyclase activating polypeptide). Ennek vizsgálata azért is fontos, mert ez a fehérje erőteljesen csökkenti a szöveti károsodást olyan gyakori, sok embert érintő betegségekben, mint például a stroke, a Parkinson-kór, illetve a retina károsodása. A munkákat a PTE Anatómiai Intézetével együtt végezzük.

Peptidimmunológiai kutatások

A peptid-, illetve fehérjefoszforiláció a sejtfolyamatok talán legfontosabb szabályozó lépése. Az ELTE Immunológiai Tanszékével együttműködve évek óta vizsgáljuk az immunrendszer működésében fontos szerepet játszó néhány fehérjekomplex (pl. a Grb2/Gab1) asszociációjának mechanizmusát. A biológiai vizsgálatok megkövetelik a foszforilált származékok oly módon történő sejtbejuttatását, amely nem károsítja a sejtfunkciókat. A Gab1 (Grb2-asszociált kötő fehérje 1) egyike a sejten belüli kapcsoló fehérjéknek, melyek részt vesznek a különböző növekedési faktorok, citokinek és antigén receptorok által közvetített jelátviteli folyamatokban. A Gab kapcsoló fehérjék PH doménje megköti az inozitol trifoszfátot (PIP3-at) a membránban, tirozin aminosavai pedig az SH2 doménal rendelkező jelátviteli molekulákhoz kapcsolódnak. A Gab1 beavatkozhat a B-sejtek jelátviteli folyamataiba, befolyásolva ezzel a B-sejtek aktivációját. Fő célunk olyan sejtpermeabilis foszfopeptidek létrehozása, melyek a B-sejt aktivációt befolyásolva meggátolhatják a B-sejtes tumorok proliferációját. A fenti kutatások az ELTE Immunológiai Tanszékével kooperációban történtek.

Neurodegenerációs kutatások

Intézetünk az 1990-es évek óta foglalkozik az Alzheimer-kór kutatásával. Ennek az egyre gyakoribb, elsősorban időskori memóriavesztéssel járó

betegségnek olyan tragikusak az egészségügyi mutatói, hogy kutatók tízezrei dolgoznak ma is a megfelelő kezelés vagy gyógyszer megtalálásán. A szakirodalomban ma már kb. 100 000 publikáció, jelentés, összefoglaló jelent meg, amelyek Alzheimer-kórral foglalkoznak. A gyógyszerkutatást különösen megnehezíti, hogy maga a kór nem egységes eredetű, a betegség indításának számos pontja van (pl. agyi kapillárisok működési zavarai, oxigén- és glükózhány az agyban, a mikroglium működése, mechanikus agyi sérülések, genetikai okokból az ún. β -amiloid polipeptid túltermelése stb.).

Racionális gyógyszertervezés nem indulhat el a betegség biológiai alapjainak, patomechanizmusának megismerése nélkül, ezért intézetünkben több biológiai laboratóriumot alakítottunk ki az alapok tisztázására, részben egy regionális tudásközpont pályázati támogatásával (Dél-Alföldi Neurobiológiai Tudásközpont).

Az Alzheimer-kór patomechanizmusának tisztázására a kísérleteinkben toxikus humán β -amiloidot túltermelő transzgenikus egértörzset használtuk. Kutatásainkat az Európai Unió is nagymértékben támogatta, és 14 európai kutatócsoporttal működtünk együtt a projekteinkben.

Azt találtuk, hogy a betegség patomechanizmusában döntő szerepet játszik az idegsejt belsejében lévő, a fehérjék bioszintézisében és térszerkezetének kialakításában kulcsszerepű sejtservecske, az endoplazmás retikulum. Az Alzheimer-kór gyógyszereinek lehetséges támadáspontja a sejt belsejében képződő β -amiloid, ennek képződését, ill. toxikus hatásait kell megakadályozni. (Az eddigi gyógyszerkísérletek valószínűleg azért voltak eredménytelenek, mert az idegsejteken kívüli extracelluláris amiloid-plakkokat távolították el). Két olyan vegyületcsoportot találtunk, amelyek valamilyen mechanizmussal megakadályozzák a β -amiloid toxicitását, mind in vitro, mind az Alzheimer-kór modell transzgenikus egerekben. Ezek a vegyületek enzimrezisztens peptidok ill. peptidmimetikumok. Mindkét vegyületcsoportra szabadalmi védelmet kértünk.

Többszörös diszulfidhidat tartalmazó peptidok szintézise

A cisztein az egyik legérdekesebb fehérjealkotó aminosav. Merkaptocsoportja számos egyedi tulajdonsággal ruházta fel, így fontos szerepet játszik fémionok komplexálásában, biológiai redox rendszerek (pl. glutation), acil donor vegyületek (koenzim A) képzésében. A fentiek mellett a cisztein-cisztin rendszer a fehérje-konformáció stabilizálásában fontos szerepet játszó diszulfidhidak miatt is alapvető jelentőségű. V. du Vigneaud 1955-ben Nobel-díjjal jutalmazták.

zott munkássága is diszulfidhidas peptidek szintézise volt, amelyek azonban csak egyetlen diszulfidhidat tartalmaztak. Még ez az egy is kétféleképpen alakulhat ki, intra- és intermolekuláris módon. Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben számos előrelépés történt a peptidkémiaiában, a szabad tiolfunkciók kontrollált módon a megfelelő diszulfidhiddá történő alakítása továbbra is kihívás maradt. Ennek fő oka a többszörös regioszelektív diszulfidképzés nehézsége. Napjainkban már számos olyan fontos biológiailag aktív peptid ismert, amelyek többszörös diszulfidhidakat tartalmaznak (peptid toxinok, endotelinek, inzulinok, defenzinek, miniproteinek). E peptideknél nemcsak a regioszelektív szintézis, hanem a szerkezetigazolás is kihívásnak tekinthető. Célunk volt új szintézisek kidolgozása, többszörös diszulfidhidat tartalmazó peptidek (farmakológiailag fontos peptid toxinok) racionális előállítás, és a kapott diszulfidhidak helyzetének igazolása.

A többszörös diszulfidhidat tartalmazó peptidek népes családjából kétféle vegyülettel foglalkoztunk: peptid toxinokkal és antifungális miniproteinekkal. Az előbbi képviselői például a skorpiótoxinok, míg az utóbbiak közé tartoznak a gombák által termelt defenzinszerű kis fehérjék. E peptidek szintézisére két fő megközelítés adódik:

1. Azonos védőcsoportok használata a szulfhidril csoportok védelmére, majd ezek után alkalmas körülmények keresése a természetesnek megfelelő diszulfidhid mintázat elérésére.
2. Ortogonális védőcsoportok alkalmazása a ciszteinoldalláncok védelmére, és a diszulfidhidak egymás utáni kiépítése.

Amennyiben azonos védőcsoportokat használunk a ciszteinek szulfhidril-csoportjainak védelmére, akkor az oxidatív folding a kérdéses. Minden egyes peptidre meg kell találni azokat a körülményeket, amelyek között a természetes diszulfidhid mintázat alakul ki. Ha ortogonális stratégiával próbálkozunk, akkor két probléma okoz nehézséget. Az egyik a rendelkezésre álló szulfhidril védőcsoportok viszonylag szűk köre, amely Boc kémiát és natív kémiai ligációt alkalmazva különösen igaz. A másik pedig az a tény, hogy egyes védőcsoporteltávolítási módszerek felbonthatják az előzetesen kialakított diszulfid hidakat. Ez utóbbi esetben elveszítjük az ortogonális stratégia előnyét: a diszulfidhidak irányított kialakításának lehetőségét. Az általunk vizsgált esetekben, néhány toxin (charybdotoxin, iberiotoxin és anuroctoxin), valamint a PAF antifungális peptid szintézise során a ciszteinoldalláncok azonos védőcsoporttal való ellátása vezetett jobb eredményre. A fenti kutatások során a térszerkezet-vizsgálati és biológiai munkák részben a DE kutatásaival kooperációban történtek.

Mesterséges építőkövek, foldamerek tervezése, szintézise és vizsgálata

Az első „foldamert” 1937-ben írták le magyar kutatók (Ivánovics és Bruckner). Ez az antrax tokanyaga, amely gamma-peptidkötéseket tartalmaz – így tulajdonképpen kielégíti az utóbbi 1-2 évtizedben intenzíven kutatott terület, a foldamerkémia kritériumait. Intézetünk az SZTE Gyógyszerészi Kémiai Intézetével együttműködve több mint tíz éve foglalkozik olyan módosított peptidek szintézisével és vizsgálatával, amelyek szabályozott módon vesznek fel magasabb hierarchiájú szerkezeteket. A biológiai felismeréshez azonban a megfelelő gerincszerkezet mellett szükségesek lehetnek az építőköként szereplő aminosavak oldalláncai, az itt található funkciós csoportok, módosítások. Jelenleg hidroxilált foldamer molekulák foszforilált- ill. glikozilált származékainak előállításán dolgozunk.

Peptid-foszfátészterek szintézise

Annak ellenére, hogy a peptid-, ill. fehérjefoszforiláció az egyik legfontosabb sejtfolyamat-szabályozó elem, érdekes módon hosszú ideig nem foglalkoztak ilyen módosított peptidszármazékok szintézisével. Csak az 1980-as években jelentek meg az első úttörő közlemények. Ennek oka részben a foszfátbeépítés problémáiban, részben a foszfopeptidszintézis során fellépő mellékreakciókban keresendő. Ezek a problémák aminosavfüggők: tirozin esetében inkább a foszforiláció jelent problémát a fenolos hidroxil nem kielégítő nukleofilicitása miatt, míg a szerin és treonin esetében a könnyebb kiépítés után a kapott származék instabilitása okoz gondot. Munkánk során mind a szilárd fázison, mind az oldatfázisban történő foszfátbeépítést alkalmaztunk. A peptidek szintézisére általában Fmoc technikát használtunk, a megfelelő, szabad hidroxil csoportot tartamazó aminosav beépítése után foszfit csoportot építettünk be, majd ezt foszfáttá oxidáltuk, és a peptidláncot tovább építettük. Kidolgoztuk a Boc módszerrel szintetizált peptidek utólagos foszforilezését foszforamidit reagens felhasználásával. Kipróbáltuk a synthon módszert is – ezt azonban kevésbé hatékonynak találtuk.

Összefoglalva: alkalmas módszereket dolgoztunk ki, ill. adaptáltunk foszfopeptidek szintézisére, izolálására, szerkezetbizonyítására és jellemzésére. CD és FTIR spektroszkópiai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy ezekben az esetekben a foszfát csoport beépülése általában a rendezettség növekedése, és ezen belül is a β -szerkezetek arányának növekedése arányába tolja el a konformációs egyensúlyokat.

Glikozilált peptidek szintézise

Napjainkban a glikozilált peptidek előállítása az egyik legnagyobb kihívás a peptidkémiaiában. Ezt részben a szénhidrát-rész előállítási problémái, az összekapcsolás nehézségei, másrészt a szénhidrát-rész érzékenysége okozzák. Két fő stratégia ismeretes a glikopeptidek előállítására: a *synthon* néven ismert retroszintetikus eljárás, valamint a globális (konvergens) módszer, amikor a megfelelően védett polipeptidet utolsó lépésként glikozilálják, majd a többé már nem szükséges védőcsoportokat eltávolítják. Mindkét módszer megvalósítható szilárd, illetve folyadékfázisban. Mivel a glikoziláció az aminosav oldalláncában található O, illetve N atomon is lejátszódhat, ezért különböző szintézisstratégiák kidolgozása szükséges. Munkánk során több különböző szintézisstratégiát vizsgáltunk meg különböző modell-peptidek glikozilációjára. A szintézisek során kitobióz, galaktozil-xilóz, mannozil-N-acetil-glikozil-N-acetil-glükózamin mono-, di- és triszacharidot használtuk, és egyes alkalmazott stratégiák sikeresnek bizonyultak a glikokonjugátumok előállítására.

Biokonjugátumok szintézise

Biokonjugátumok alatt értjük azokat a molekulákat, amikor egy vagy több biológiai aktivitással rendelkező molekulát (ezek lehetnek természetes anyagok, gyógyszerek) egymással vagy valamilyen jelző vagy hordozó anyaggal kapcsolunk össze abból a célból, hogy felszívódási, transzport vagy metabolikus sajátágaikat, immunogencitásukat, mellékhatásaikat nyomonkövethetőségüket megváltoztassuk. Munkánk során elsősorban transzporterfehérjék modulálásával és nem szteroid gyulladáscsökkentők nem kívánt mellékhatásainak csökkentésével foglalkoztunk.

A humán genom szekvenciájának proteomikai kutatások meghatározása után a figyelem a gének által kódolt fehérjék felé fordult, mert az élő szervezetben molekuláris szinten a biokémiai folyamatokat legfőképpen fehérjék szabályozzák. A fehérjék „high throughput” analízisével a posztgenom éra tudománya, a proteomika foglalkozik. Analitikai laboratóriumunk megalakulása óta aminosavak és peptidek kromatográfiás, elektroforetikus és tömegspektrometriás analízisével foglalkozott. Ilyen infrastrukturális és humán erőforrás háttérrel alakítottuk meg Magyarország első Proteomikai Laboratóriumát. A proteomika területén végzett munkáink egyrészt módszerfejlesztési jellegűek, másrészt orvosi és biológiai problémák felderítéséhez járulnak hozzá.

Módszerfejlesztések

A biológiai mintákból származó komplex fehérjekeverékek elválasztására egyik legalkalmasabb módszer a poliakrilamid gélelektroforézis. Az 1D és 2D poliakrilamid-gélelektroforézissel elválasztott fehérjék korrekt mennyiségi meghatározása nem megoldott. Egy-egy biológiai mintában több 10 000, de akár 100 000 különböző fehérje is lehet, azonban a legnagyobb 2D-gélen ennek csak töredéke, a legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjék láthatók. A többi fehérje mennyisége a detektálás érzékenységi szintje alatt van, vagy egy megfestett látható foltban több fehérje is található. Egy olyan „label-free” tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki, ill. fejlesztünk tovább, ami lehetőséget teremt a gélben elválasztott fehérjék relatív és abszolút mennyiségének kvantitatív analizisére. Módszerünk nagy jelentőségű, mert megkönnyíti a biológusok részére a kísérleti fehérje-expressziós különbségek megállapítását.

A „bottom-up” fehérjeazonosítás alapvető lépése a fehérjék enzimatis vagy irányított kémiai reagensekkel történő feldarabolása. A proteomikában leggyakoribb a tripszin alkalmazása, mert specifikusan a Lys és az Arg aminosavak C-terminálisánál hasítja el a peptidláncot. A szerkezetmeghatározáshoz gyakran szükség van azonban olyan reagensekre is, amik specifikusan egy-egy aminosav előtt, vagy után hasítják el a kötéseket. A 2-nitro-5-tiocianobenzoesav (NTCB) és 1-ciano-4-dimetilamino-piridinium tetrafluoroborát (CDAP) cianilezés után a Cys aminosav N-terminálisán hasítja a kötést. Tömegspektrometriás vizsgálataink során azt tapasztaltuk azonban, hogy a reakciókörülmények változtatásával előtérbe kerülnek a Ser és Thr aminosavak N-terminálisán történő hasítások. A módszerünk továbbfejlesztésével peptidek, fehérjék szerkezetének pontosabb feltérképezése válik lehetővé.

Orvostudományi kutatások támogatása

Proteomikai módszerek segítségével meghatározható pl. betegségek hatására fehérjeszinten bekövetkező minőségi és mennyiségi változások, melynek eredményei a pl. betegségek diagnosztikájában és a gyógykutatásban alkalmazhatók. Az elmúlt években két pszichiátriai betegség, a depresszió és a szorongás során az agyban bekövetkező változások molekuláris szintű felderítésén dolgoztunk. Módszereket dolgoztunk ki az agyi fehérjeösszetétel kvalitatív és kvantitatív meghatározására. 1D-, 2D-elektroforetikus, ill. kromatográfiás elválasztásokkal vizsgálva a pszichiátriai betegségek állatmodelljeiben fellépő agyi fehérjeösszetétel-változást megállapítottuk, hogy az egyes agyterületeken

(amygdala, cortex) különböző folyamatok játszódnak le. Az eredményekből bioinformatikai módszerekkel következtetéseket vontunk le a szorongás által érintett molekuláris folyamatokról. Így változásokat találtunk az oxidatív stressz-válaszban, a szinaptikus dokkolás és a metabolikus útvonalakban. A kifejlesztett szorongásos állatmodellel további kísérleteket tervezünk a betegség mélyebb megismerése céljából.

A biológiai rendszerek működésének jobb megismerése érdekében kutatási területünket néhány évvel ezelőtt kiegészítettük a **lipidomika** módszereivel. Módszert fejlesztettünk ki foszfolipidek biológiai folyadékokból és szövetekből történő meghatározására: folyadék-folyadék extrakció után az egy- és kétdimenziós HPLC elválasztást követő tömegspektrometriás detektálással nyert adatokat speciális lipidomikai-metabolomikai szoftverrel tudjuk kiértékelni. A módszer alkalmazásával szerb–magyar kooperációban lipidomikai biomarker-kutatásokat végzünk petefészekrák korai diagnosztikájához. A szorongás mint pszichiátriai betegség molekuláris szintű értelmezéséhez a korábban proteomikai vizsgálatokhoz használt állatmodelben lipidomikai vizsgálatokat végzünk.

Irodalomjegyzék:

- Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, **36** (3), 2982–2992, 1903
- Fülöp Ferenc, Martinek Tamás A, Tóth Gábor K: Application of alicyclic beta-amino acids in peptide chemistry, Chemical Society Reviews, **35**(4), 323–334, 2006
- Fülöp Livia, Penke Botond, Zarándi Márta, Bozsó Zsolt, Virók Dezső, Janáky Tamás, Vedier Yann, Datki Zsolt, Szegedi Viktor, Busa-Fekete Róbert, Soós Katalin, Kasza Ágnes, Kocsor András, Borbély Emőke: Small peptide inhibitors of β -amyloid toxicity, Reg. P1300317, 2013. május 17., PCT 1400042
- Fülöp Livia, Penke Botond, Zarándi Márta, Bozsó Zsolt, Berkecz Róbert, Janáky Tamás, Martinek Tamás, Datki Zsolt, Szegedi Viktor, Soós Katalin, Penke Zsuzsa, Borbély Emőke: Peptides and peptidomimetics for the therapy of neurodegenerative diseases and use thereof, P1400207, 2014. április 17.
- Ivánovics György, Bruckner Viktor: Über die chemische Natur der immunspezifischen Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen, Naturwissenschaften, Vol. 25 16, 250, 1937

- Kerékgyártó János, Kalmár László, Szurmai Zoltan, Hegyi Orsolya, Tóth Gábor K: Synthesis of N-Glycopeptides by Convergent Assembly, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18:(1), 1–5, 2012
- Kertész Ákos, Váradi Györgyi, Fajka-Boja Roberta, Tóth Gábor K, Monostori Éva, Sármay Gabriella: Optimization of the cellular import of functionally active SH2-domain-interacting phosphopeptides, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63:(22), 2682–2693, 2006
- Kupihár Zoltán, Kele Zoltán, Tóth Gábor K: The H-phosphonate approach to the synthesis of phosphopeptides on solid phase, *Organic Letters*, 3:(7), 1033–1035, 2001
- Medzihradszky Kálmán: Peptidkémiai kutatások Magyarországon, 1937–1993, *Magyar Kémiai Folyóirat*, 100. évfolyam, 235–247, 1994. június
- Philip E. Dawson, Tom W. Muir, Ian Clark-Lewis, Stephen Brian Henry Kent: Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, Vol. 266 no. 5186, 776–779, 1994
- Rákosi Kinga, Szolomájer-Csikós Orsolya, Kalmár László, Szurmai Zoltán, Kerékgyártó János, Tóth Gábor K: Synthesis of N-glycopeptides applying glycoamino acid building blocks with a combined Fmoc/Boc strategy, *Protein and Peptide Letters*, 18, 679–683 (2011).
- Robert Bruce Merrifield: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, 85 (14), 2149, 1963
- Stephen B. H. Kent: Total chemical synthesis of proteins, *Chemical Society Review*, 38, 338–351, 2009
- Tanaka Masaru, Rákosi Kinga, Tóth Gábor K, Telegdy Gyula: Antidepressant-like effects of urocortin 3 fragments, *Brain Research Bulletin*, 84, 414–418, 2011
- Telegdy Gyula, Kádár Kinga, Tóth Gábor K: Anxiolytic action of urocortin 3 fragments in mice, *Behavioural Brain Research*, 222, 295–298, 2011
- Tóth Gábor K, Kele Zoltán, Váradi Györgyi: Phosphopeptides – Chemical Synthesis, Analysis, Outlook and Limitations, *Current Organic Chemistry*, 11:(5), 409–426, 2007
- Tóth Gábor K, Penke Botond, Zarándi Márta, Kovács Kálmán: Comparison and optimization of synthetic methods for preparing cholecystokinin peptides, *International Journal of Peptide and Protein Research*, Volume: 26 Issue: 6, 630–638, 1985
- Váradi Györgyi, Tóth Gábor K., Kele Zoltán, Galgóczy László, Fizil Ádám, Batta Gyula: Synthesis of PAF, an Antifungal Protein from *P. chrysogenum*, by Native Chemical Ligation: Native Disulfide Pattern

and Fold Obtained upon Oxidative Refolding, Chemistry-A European Journal, 19:(38), 12684–12692, 2013

- Varga Zoltán, Panyi György, Tóth Gábor, Rákosi Kinga: Modified Anuroctonus peptide toxins for treatment of autoimmune and metabolic disease., Lajstromszám: WO2013061106A1, 2013
- Vincent Du Vigneaud, Charlotte Ressler, John M. Swan, Carleton W. Roberts, Panayotis G. Katsoyannis: Oxytocin: synthesis, Journal of the American Chemical Society, 76. (12), 3115–3118, 1954